

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-316600

(43) 公開日 平成4年(1992)11月6日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 15/12	Z N A	7731-4H		
A 6 1 K 39/395	A B C U	8413-4C		
	A D V			
	A D Y			
C 1 2 N 5/10				

審査請求 未請求 請求項の数11(全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-76743

(22) 出願日 平成3年(1991)3月15日

(31) 優先権主張番号 9 0 0 5 9 6 2

(32) 優先日 1990年3月16日

(33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(31) 優先権主張番号 9 0 1 9 3 2 3

(32) 優先日 1990年9月5日

(33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 591005590

サンド・アクチエンゲゼルシャフト

SANDOZ AKTIENGESELL
SCHAFT

スイス国シーエイチ-4002バーゼル・リヒ
トシュトラーセ35

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

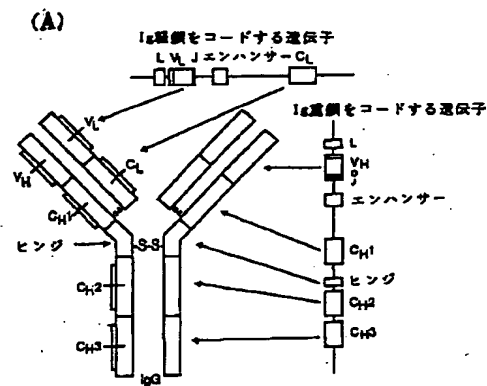
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD25結合分子

(57) 【要約】

【目的】 拒絶反応の予防または治療に用い得る新規抗CD25抗原抗体の提供。

【構成】 高可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を順に含む少なくとも1つのドメインを含む少なくとも1つの抗原結合部位を含むCD25結合分子であって、前記CDR1がアミノ酸配列Arg-Tyr-Trp-Met-Hisを有し、前記CDR2がアミノ酸配列Ala-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Ser-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Glu-Glyを有し、前記CDR3がアミノ酸配列Asp-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Phe-Asp-Pheを有する、CD25結合分子またはその直接的均等物。



(B)



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 高可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を順に含む少なくとも1つのドメインを含む少なくとも1つの抗原結合部位を含むCD25結合分子であって、前記CDR1がアミノ酸配列Arg-Tyr-Trp-Met-Hisを有し、前記CDR2がアミノ酸配列Ala-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Ser-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Glu-Glyを有し、前記CDR3がアミノ酸配列Asp-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Phe-Asp-Pheを有する、CD25結合分子またはその直接的均等物。

【請求項2】 a) 高可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を順に含み、前記CDR1がアミノ酸配列Arg-Tyr-Trp-Met-Hisを有し、前記CDR2がアミノ酸配列Ala-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Ser-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Glu-Glyを有し、前記CDR3がアミノ酸配列Asp-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Phe-Asp-Pheを有するものである、第1ドメイン、および

b) 高可変領域CDR1'、CDR2'およびCDR3'を順に含み、前記CDR1'がアミノ酸配列Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Ile-Ser-Tyr-Met-Glnを有し、前記CDR2'がアミノ酸配列Asp-Thr-Ser-Lys-Leu-Ala-Serを有し、前記CDR3'がアミノ酸配列His-Gln-Arg-Ser-Ser-Tyr-Thrを有するものである、第2ドメインを含む少なくとも1つの抗原結合部位を含む、請求項1記載のCD25結合分子またはそれらの直接的均等物。

【請求項3】 少なくとも、

a) 1位のアミノ酸から始まり、117位のアミノ酸で終わる配列番号1に示された配列と実質的に等しいアミノ酸配列を有する可変領域およびひと重鎖の不変部分を含む1個の重鎖、および

b) 1位のグルタミン酸から始まり、104位のグルタミン酸で終わる配列番号2に示された配列と実質的に等しいアミノ酸配列を有する可変領域およびひと軽鎖の不変部分を含む1個の軽鎖を含む、請求項2記載のCD25結合分子。

【請求項4】 重鎖またはそのフラグメントをコードし、

a) 交互にフレーム構造および高可変領域を含む可変ドメインをコードし、前記高可変領域が順にCDR1、CDR2およびCDR3であり、そのアミノ酸配列が配列番号1に示されている第1部分であって、可変ドメインの最初のアミノ酸をコードするコドンから始まり、可変領域の最終アミノ酸をコードするコドンで終わる第1部分、および

b) 重鎖の不変部分の最初のアミノ酸をコードするコドンから始まり、不変部分またはそのフラグメントの最終アミノ酸をコードするコドン、次いでナンセンスコドンで

2

終わる重鎖不変部分またはそのフラグメントをコードする第2部分を含むDNA構築物。

【請求項5】 軽鎖またはそのフラグメントをコードし、

a) 交互にフレーム構造および高可変領域を含む可変ドメインをコードし、前記高可変領域が順にCDR1'、CDR2'およびCDR3'であり、そのアミノ酸配列が配列番号2に示されている第1部分であって、可変ドメインの最初のアミノ酸をコードするコドンから始まり、可変領域の最終アミノ酸をコードするコドンで終わる第1部分、および

b) 軽鎖の不変部分の最初のアミノ酸をコードするコドンから始まり、不変部分またはそのフラグメントの最終アミノ酸をコードするコドン、次いでナンセンスコドンで終わる軽鎖不変部分またはそのフラグメントをコードする第2部分を含むDNA構築物。

【請求項6】 (i) 請求項4記載のDNA構築物および請求項5記載のDNA構築物により形質転換された生物を培養し、(ii) 培養物から活性CD25結合分子を採取することを含む、マルチ鎖CD25結合分子の製造方法。

【請求項7】 本発明のCD25結合分子および医薬的に許容し得る担体または希釈剤を含む、ひと免疫系の免疫抑制、またはCD25+細胞の悪性の処置、またはHIV感染の処置を目的とする医薬組成物。

【請求項8】 少なくとも1つのCD25結合分子および活性化T細胞を特徴づけるCD25以外の少なくとも1つの抗原に対する少なくとも1つの抗原結合分子から成る混合物を含む、免疫抑制組成物。

【請求項9】 CD25結合分子が、請求項1~3のいずれか1項記載のCD25結合分子である、請求項8記載の組成物。

【請求項10】 キメラCD7抗体と一緒に請求項3記載のキメラCD25抗体を含む、請求項9記載の組成物。

【請求項11】 混合または付随的投与に関する使用説明書と一緒に、活性化T細胞に対する少なくとも2つの抗体の個別単位用量形態を含み、前記抗体が活性化T細胞を特徴づける少なくとも2つの抗原を認識し、その一方がCD25抗原であるツインパック。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、免疫抑制に関するものであり、さらに特定すれば、モノクローナル抗体およびCD25抗原に対する他の結合分子を提供する。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】 臓器移植手術、特に腎臓、肝臓、心臓、肺および骨髄移植手術では、移植体受容者の免疫系を抑制して、手術後の移植体拒絶の可能性を最小限に抑える必要がある。これを目的とした様々な

3

免疫抑制剤が提案されているが、ある種の免疫抑制剤の使用により生ずる望ましくない副作用に加えて、免疫抑制作用の結果、移植体受容者はまた、正常免疫系により制御されていた細菌またはウイルス感染に特にかかりやすくなるため、それらの使用は慎重に制御されなければならない。臨床的実践においてうまく使用されている免疫抑制剤には、ステロイド類、アザチオプリンおよびシクロスポリンAがある。臨床的実践では、移植体拒絶症状発現の阻止または処置に必要な免疫抑制程度と、他の感染源と戦うと同時に生じ得る望ましくない副作用を制御下に維持するためのある量の受容者免疫系の保持とをつり合わせる試みが必要である。また、免疫抑制剤の使用に加えて、免疫反応を抑制するためのある種のモノクローナル抗体(MAbs)の使用が注目されており、特にT細胞の様々な表面抗原を認識するモノクローナル抗体が注目されている。この場合もまた、臨床的実践において、先行技術による抗体ではあまりに強力すぎるか、または充分には有効でなく、深刻な副作用、例えば高熱を誘発することもあるという問題に直面している。

【0003】これらのモノクローナル抗体は、一般に連続的白血球類型研究会(Leucocyte Typing Workshops)により割り当てられたCD(クラスターデターミネーション)番号により明示される。例えばCD3という語は現在細胞表面抗原に対して頻繁に適用されており、この抗原に対するMAbは「抗CD3」と記載されることも多いが、以下の記載において、例えばCD3、CD25等といった語はモノクローナル抗体に適用され、対応する細胞表面抗原は「CD3抗原」等と記載される。特に、全T細胞上に存在する膜抗原(パンT細胞抗原とも呼ばれている)、例えばCD3抗原に対するモノクローナル抗体は、それらが免疫系に対して全体的な抑制活性を有する点で非常に強力な抗体である。従って、一旦感染が生じると、記憶T細胞が通常仲介する即時免疫応答が人体から剥奪され得る。移植体拒絶症状発現の治療ではなく予防を試みている場合、これは必ずしも望ましいことではない。予防での使用に適した処置は本質的に選択的であるべきである、すなわち、記憶T細胞のプールを無傷の状態に保つべきであり、かつ拒絶事象に直接関与し得る範ちゅうのT細胞(活性化T細胞)は不活化されるべきである。

【0004】

【課題を解決するための手段】この望ましい目標は、活性化T細胞に対する抗体を用いて達成され得る。これらのT細胞は、それらの膜表面における高親和性IL-2レセプターの存在を特徴とする。高親和性IL-2レセプターは、少なくとも2つの相異なるポリペプチド鎖、すなわちCD25抗原としても知られている α -鎖および β -鎖により構成される。残りのT細胞は、この高親和性レセプターを発現しないが、 α -および β -鎖ホモ2量体から成る低および中程度の親和性レセプターを発

4

現する。高親和性レセプターに対するIL-2の結合を妨害するため、選択的に免疫応答を抑制するCD25抗体は、移植体拒絶発現症状の予防に優れた抗体である。

【0005】天然免疫グロブリンまたは抗体は、各上部アームの最後に抗原結合部位を有する一般にY形状のマルチマー分子を含む。この構造の残り、特にYの幹は、免疫グロブリンと関連したエフェクター機能を伝達する。IgGクラスの抗体の一般的構造を図1Aに概略的に示す。重および軽鎖は両方とも可変ドメインおよび不変部分を含む。抗原結合部位は、軽鎖の可変ドメインを随伴した重鎖の可変ドメインにより構成される。重および軽鎖の可変ドメインは、図1Bに示されている同じ一般的構造を有する。さらに特定すれば、抗体の抗原結合特性は、高可変領域または相補性決定領域(CDR)と呼ばれる重および軽鎖の可変ドメインにおける3つの特異領域により本質的に決定される。図1Bに示されている通り、これらの3つの高可変領域は、配列が比較的保存されており、結合に直接は関与しない4つのフレーム構造領域(FR)と交互に存在する。CDRはループを形成し、大きく β -シート立体配座を採るフレーム構造領域により極めて近い位置で保持される。重鎖のCDRは関連した軽鎖のCDRと一緒にあって、抗体分子の抗原結合部位を構成する。FRまたはCDR領域を構成するものについては、通常、同じ種類で産生される若干の抗体のアミノ酸配列を比較することにより決定される。CDRおよびFR領域の一般的同定規則を表1に示す。

【0006】さらに、最近では、結合エネルギー論に対する軽鎖可変ドメインの分担度合は、関連した重鎖可変ドメインの場合と比べて小さいこと、および単離された重鎖可変ドメインはそれら自体で抗原結合活性を有することが見出された。それらの分子は、共通して現在単一ドメイン抗体と呼ばれている。幾つかのネズミCD25モノクローナル抗体は既に存在しており、3B3-1(イムノテク-メリュー)、BD α IL-2R(ベクトン-ディッキンソン)、2C8(アマーシャム)、キャンパス6(MRC、キャンブリッジ)およびATH207(フリー・ユニバーシティ、ベルリン)がある。しかしながら、IgG2aアイソタイプの新規マウスCD25抗体(以後、RFT5-IgG2aと称す)は、特に結合親和力に関して先行技術のCD25抗体よりも優れた特性を有すること、およびRFT5-IgG2aと同じ高可変領域を有する他のCD25結合分子の構築も可能であることが見出された。

【0007】

【発明の構成】従って、本発明は、高可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を配列中にまたは順次(in sequence)含む少なくとも1つのドメインを含む少なくとも1つの抗原結合部位またはその直接的均等物を含むCD25結合分子であって、前記CDR1がアミノ酸配列Arg-Tyr-Trp-Met-Hisを有し、前記CDR2

5

がアミノ酸配列Ala-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Ser-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Glu-Glyを有し、前記CDR3がアミノ酸配列Asp-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Phe-Asp-Pheを有するCD25結合分子を提供する。発明の第1態様において、CD25結合分子は、単一ドメインを含む単一抗原結合部位を含む。発明の第2態様において、CD25結合分子は、

a) 高可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を配列中にまたは順次(in sequence)含み、前記CDR1がアミノ酸配列Arg-Tyr-Trp-Met-Hisを有し、前記CDR2がアミノ酸配列Ala-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Ser-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Glu-Glyを有し、前記CDR3がアミノ酸配列Asp-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Phe-Asp-Pheを有するものである、第1ドメイン、および

b) 高可変領域CDR1'、CDR2'およびCDR3'を配列中にまたは順次(in sequence)含み、前記CDR1'がアミノ酸配列Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Ile-Ser-Tyr-Met-Glnを有し、前記CDR2'がアミノ酸配列Asp-Thr-Ser-Lys-Leu-Ala-Serを有し、前記CDR3'がアミノ酸配列His-Gln-Arg-Ser-Ser-Tyr-Thrを有するものである、第2ドメインを含む少なくとも1つの抗原結合部位またはそれらの直接的均等物を含む。特記しない場合、以後、ポリペプチド鎖は全て、N-末端の先端部(N-terminal extremity)から出発し、C-末端の先端部で終わるアミノ酸配列を有するものとして記載する。抗原結合部位が第1および第2ドメインを両方とも含む場合、これらは同じポリペプチド分子上に位置し得るか、または好ましくは、各ドメインは異なる鎖に存在し得、第1ドメインは免疫グロブリン重鎖またはそのフラグメントの一部分であり、第2ドメインは免疫グロブリン軽鎖またはそのフラグメントの一部分であり得る。

【0008】「CD25結合分子」は、単独または他の分子と共に高親和性IL-2レセプターを形成した形でCD25抗原に結合し得る分子を全て包含する。この結合反応は、非関連的特異性を有する抗体、例えば抗リソチーム抗体を使用する陰性対照試験を参考にした、例えばレセプターに対するIL-2結合の阻害を測定するためのバイオアッセイまたは任意の種類の結合検定を含む標準的方法(定性的検定)により示され得る。有利には、CD25抗原に対する本発明分子の結合は、きつ抗物質としてAHT207、BD α IL-2-Rまたは3B3-1抗体を用いたきつ抗的結合検定で示され得る。好ましくは、AHT207またはBD α IL-2-R抗体がきつ抗物質として選択される。結合検定の特定例を下記に示す。ひと末梢血単核細胞(HPBM)を、2ミリモルのL-グルタミン、100単位/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシン、25ミリモルの重炭

6

酸ナトリウムおよび10%牛胎児血清(FCS)を補った培養培地RPMI 1640において生長させる。1 μ g/mlのフィトヘマグルチニン(PHA)を用いてHPBMを刺激する。3日後、芽細胞を、2%牛血清アルブミン(BSA)および2%アジドを補った磷酸緩衝食塩水に 3.10^5 /mlの濃度で再懸濁する。この懸濁液の50 μ l試料を、非キャッピング条件下、1~100 μ g/mlの勾配濃度の遮断抗体(きつ抗物質)と10分間20℃でインキュベーションする。次いで、1 μ g/mlの割合で本発明のビオチニル化抗体を細胞に加え、インキュベーションを10分間続行する。細胞を洗浄し、さらに10分間フルオレセイン標識ストレプトアビジンとインキュベーションする。細胞を再洗浄し、ホルマリンにより固定し、ビオチニル化抗体の結合を検出するフルオロ-細胞測定器により分析する。平行して、陰性対照として非関連的特異性を有するビオチニル化抗体を用いた実験を行う。抗原結合分子の例としては、B細胞またはハイブリドーマにより産生された抗体およびキメラもしくはヒューマナイズド抗体もしくはそのフラグメント、例えばF(ab')₂およびFabフラグメント、並びに1本鎖または単一ドメイン抗体がある。1本鎖抗体は、通常10~30個のアミノ酸、好ましくは15~25個のアミノ酸から成るペプチド・リンカーにより共有結合した抗体重および軽鎖の可変ドメインにより構成される。従って、上記構造は重および軽鎖の不変部分を含まず、小ペプチド・スペーサーは全不変部分よりも抗原性を低くすべきであると考えられている。「キメラ抗体」は、重または軽鎖または両方の不変領域がヒトに由来し、両重および軽鎖の可変ドメインがヒト以外(例、ネズミ)に由来する抗体を意味する。「ヒューマナイズド抗体」は、高可変領域(CDR)がヒト以外(例、ネズミ)に由来し、免疫グロブリンの他の全部または実質的に全部の部分、例えば不変領域および可変ドメインの高保存部分、すなわちフレーム構造領域がヒトに由来する抗体を意味する。しかしながら、ヒューマナイズド抗体は、高可変領域に隣接したフレーム構造領域の部分にネズミ配列の数個のアミノ酸を保持し得る。高可変領域は、あらゆる種類、好ましくはネズミまたはヒト起源のフレーム構造領域を随伴し得る。適当なフレーム構造領域は、「シーケンシーズ・オブ・プロテインズ・オブ・イミュノロジカル・インタレスト」(Sequences of proteins of immunological interest)(キャバット等、アメリカ合衆国厚生省、パブリック・ヘルス・サービス、ナショナル・インスティテュート・オブ・ヘルス)に記載されている。しかしながら、好ましい重鎖フレーム構造は、配列番号1に示されているRFT5-IgG2aのフレーム構造である。それは、順にFR1、FR2、FR3およびFR4領域により構成される。同様に、配列番号2は、FR1'、FR2'、FR3'およびFR4'領域により順に構成される好ましいRFT5-IgG2a軽鎖フレーム構造を示す。

7

【0009】従って、本発明はまた、1位のアミノ酸から出発し、117位のアミノ酸で終わる配列番号1に示された配列と実質的に等しいアミノ酸配列を有する第1ドメインまたは上記第1ドメイン、および1位のアミノ酸から始まり、104位のアミノ酸で終わる配列番号2に示された配列と実質的に等しいアミノ酸配列を有する第2ドメインを含む少なくとも1つの抗原結合部位を含むCD25結合分子を提供する。全部のひとにおいて天然で見出される蛋白質に対して産生したモノクローナル抗体は、必ずやひと以外の系、例えばマウスにおいて開発されなければならない。この直接的結果として、ハイブリドーマにより産生された異種抗体が、ひとに投与されると、異種免疫グロブリンの不変部分が主として伝達する望ましくない免疫応答を発する。これにより、上記抗体は長期間にわたっては投与され得ないため、それらの使用は明らかに制限される。従って、1本鎖、単ドメイン、ひとに投与された場合に実質的な異型の応答を発するとは考えられないキメラまたはヒューマナイズド抗体の使用が特に好ましい。前述したことから、本発明のさらに好ましいCD25結合分子は、少なくとも

a) (i) 高可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を配列中にまたは順次(in sequence)含む可変ドメインおよび(ii)ひと重鎖の不変部分またはそのフラグメントを含み、前記CDR1がアミノ酸配列Arg-Tyr-Trp-Met-Hisを有し、前記CDR2がアミノ酸配列Ala-Ile-Tyr-Pro-Gly-Asn-Ser-Asp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Gln-Lys-Phe-Glu-Glyを有し、前記CDR3がアミノ酸配列Asp-Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Phe-Asp-Pheを有する、1つの免疫グロブリン重鎖またはそのフラグメント、および

b) (i) 高可変領域CDR1'、CDR2'およびCDR3'を配列中にまたは順次(in sequence)含む可変ドメインおよび(ii)ひと軽鎖の不変部分またはそのフラグメントを含み、前記CDR1'がアミノ酸配列Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Ile-Ser-Tyr-Met-Glnを有し、前記CDR2'がアミノ酸配列Asp-Thr-Ser-Lys-Leu-Ala-Serを有し、前記CDR3'がアミノ酸配列His-Gln-Arg-Ser-Ser-Tyr-Thrを有する、1つの免疫グロブリン軽鎖またはそのフラグメントを含むキメラ抗CD25抗体およびそれらの直接的均等物から選択される。

【0010】別法として、本発明のCD25結合分子は、

a) 高可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を配列中にまたは順次(in sequence)含み、前記高可変領域が配列番号1に示されたアミノ酸配列を有するものである、第1ドメイン、

b) 高可変領域CDR1'、CDR2'およびCDR3'を配列中にまたは順次(in sequence)含み、前記高可変領域が配列番号2に示されたアミノ酸配列を有するものであ

8

る、第2ドメイン、および

c) 第1ドメインのN-末端の先端部および第2ドメインのC-末端の先端部または第1ドメインのC-末端の先端部および第2ドメインのN-末端の先端部に結合しているペプチド・リンカーを含む抗原結合部位を含む1本鎖結合分子およびそれらの直接的均等物から選択され得る。よく知られている通り、アミノ酸配列の小さな変化、例えば1個または幾つかのアミノ酸の欠失、付加または置換により、実質的に同じ特性を有する元の蛋白質の対立遺伝子形態が誘導され得る。すなわち、「その直接的均等物」という語は、(i)全体としての高可変領域CDR1、CDR2およびCDR3が、配列番号1に示された高可変領域と少なくとも80%の相同性、好ましくは少なくとも90%の相同性、さらに好ましくは少なくとも95%の相同性を示し、そして(ii)分子Xの場合と同一のフレーム構造領域を有するが、配列番号1に示されたものと同一の高可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を有するレファレンス分子と実質的に同じ程度までレセプターへのIL-2の結合を阻害し得る単ドメインCD25結合分子(分子X)か、または(i)全体としてのCDR1、CDR2、CDR3、CDR1'、CDR2'およびCDR3'が、配列番号1および2に示された高可変領域と少なくとも80%の相同性、好ましくは少なくとも90%の相同性、さらに好ましくは少なくとも95%の相同性を示し、そして(ii)分子X'と同一のフレーム構造領域および不変部分を有するが、配列番号1および2に示されたものと同一の高可変領域CDR1、CDR2、CDR3、CDR1'、CDR2'およびCDR3'を有するレファレンス分子と実質的に同じ程度までレセプターへのIL-2の結合を阻害し得る、1結合部位に対し少なくとも2つのドメインを有するCD25結合分子(分子X')を全て包含する。この最後の特徴は、好都合にはリンパ球混合反応(MLR)生物検定、抗原特異的HPBM応答生物検定およびIL-2依存性Tリンパ芽球増殖生物検定を含む様々な検定で試験され得る。それらの検定法は、この明細書に後述されている。「同じ程度まで」という語は、レファレンスおよび均等分子が、上記で引用された生物検定の一つにおいて、統計的方法で本質的に同一のIL-2結合阻害曲線を呈することを意味する。最も好ましくは、キメラCD25抗体は、少なくとも

a) 1位のアミノ酸から出発し、117位のアミノ酸で終わる配列番号1に示された配列と実質的に同じアミノ酸配列を有する可変ドメインおよびひと重鎖の不変部分を含む1個の重鎖、および

b) 1位のグルタミン酸から出発し、104位のグルタミン酸で終わる配列番号2に示された配列と実質的に同じアミノ酸配列を有する可変ドメインおよびひと軽鎖の不変部分を含む軽鎖を含む。ひと重鎖の不変部分は、

γ_1 、 γ_2 、 γ_3 、 γ_4 、 μ 、 α_1 、 α_2 、 δ または ϵ タイ

9

ブ、好ましくは γ タイプ、さらに好ましくは γ_1 タイプに属し得、ヒト軽鎖の不变部分は、 κ または λ タイプ(これは λ_1 、 λ_2 および λ_3 サブタイプを包含する)に属し得るが、好ましくは κ タイプに属する。これら全ての不变部分のアミノ酸配列はキャバット等(前出)により与えられている。本発明のCD25結合分子のコンジュゲート、例えば酵素または毒素または放射性同位元素のコンジュゲートもまた、本発明の範囲内に包含される。本発明のCD25結合分子は組換えDNA技術により製造され得る。このためには、結合分子をコードする1個またはそれ以上のDNA分子を構築し、適当な制御配列下に置き、発現に適した宿主生物に導入しなければならない。

【0011】従って、非常に総括的には、本発明は、(i)本発明の単一ドメインCD25結合分子、本発明の1本鎖CD25結合分子、本発明のCD25結合分子の重もしくは軽鎖またはそれらのフラグメントをコードするDNA分子、および(ii)組換え手段による本発明CD25結合分子の製造における本発明DNA分子の用途を提供する。当技術分野の現状として、熟練した者であれば、この明細書で提供されている情報、すなわち高可変領域のアミノ酸配列およびそれらをコードするDNA配列が与えられれば、本発明のDNA分子を合成することができる。可変ドメイン遺伝子の構築方法は、例えばEPA239400に記載されており、次の通り短く要約され得る。何等かの特異性を有するMAbの可変ドメインをコードする遺伝子をクローン化する。フレーム構造および高可変領域をコードするDNAセグメントを決定し、高可変領域をコードするDNAセグメントを除去することにより、フレーム構造領域をコードするDNAセグメントを接合部分で適当な制限部位と融合させる。制限部位は、標準的方法によるDNA分子の突然変異誘発により適当な位置で生成され得る。2本鎖合成CDRカセットは、配列番号1または2に与えられた配列に従いDNA合成により製造される。これらのカセットには接着末端が加えられ、その結果、それらはフレーム構造の接合部分でライゲーションされ得る。免疫グロブリン可変ドメインをコードするDNA分子を得るためのプロトコルを図5に示す。さらに、本発明のモノクローナル抗体をコードするDNA構築物を得るのに、生産性ハイブリドーマ・セルラインからmRNAに接近することは必要ではない。すなわち、PCT出願WO90/07861は、遺伝子のヌクレオチド配列に関して書かれた情報しか与えられていない組換えDNA技術によるMAbの製造について充分な指示を与えている。この方法は、若干のオリゴヌクレオチドの合成、PCR方法によるそれらの増幅および所望のDNA配列を得るためのそれらのスプライシングを含む。重および軽鎖不变部分をコードする適当なプロモーターまたは遺伝子を含む発現ベクターは、一般に入手可能である。すなわち、一旦本発明の

10

DNA分子が製造されると、それは、好都合には適当な発現ベクターへ導入され得る。また、1本鎖抗体をコードするDNA分子は、標準的方法、例えばWO88/1649の記載に従い製造され得る。前述したこと、およびハイブリドーマにより天然に分泌されるマウスMAbは好ましいタイプのMAbではないことから、記載の基準に充分に応じる必要のあるハイブリドーマ寄託物は無いと考えられる。

【0012】本発明の特定態様において、CD25結合分子を製造するための組換え手段は、下記の通り、第1および第2DNA構築物を含む。第1DNA構築物は、重鎖またはそのフラグメントをコードし、

a) 択一的または交互に(alternatively)フレーム構造および高可変領域を含む可変ドメインをコードし、前記高可変領域が順にCDR1、CDR2およびCDR3であり、それらのアミノ酸配列が配列番号1に示されている第1部分であって、可変ドメインの最初のアミノ酸をコードするコドンから出発し、可変ドメインの最後のアミノ酸をコードするコドンで終わる第1部分、および

b) 重鎖の不变部分の最初のアミノ酸をコードするコドンから出発し、不变部分またはそのフラグメントの最後のアミノ酸をコードするコドン、次いでナンセンスコドンで終わる重鎖不变部分またはそのフラグメントをコードする第2部分を含む。好ましくは、この第1部分は、1位のアミノ酸から出発し、117位のアミノ酸で終わる配列番号1に示されたアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列を有する可変ドメインをコードする。さらに好ましくは、第1部分は、142位のヌクレオチドから出発し、492位のヌクレオチドで終わる配列番号1に示されたヌクレオチド配列を有する。また好ましくは、第2部分は、ヒト重鎖の不变部分、さらに好ましくはヒト γ 1鎖の不变部分をコードする。この第2部分は、ゲノム起源のDNAフラグメント(イントロンを含む)またはcDNAフラグメント(イントロンを含まず)であり得る。第2DNA構築物は、軽鎖またはそのフラグメントをコードし、

a) 択一的または交互に(alternatively)フレーム構造および高可変領域を含む可変ドメインをコードし、前記高可変領域が順にCDR1'、CDR2'およびCDR3'であり、それらのアミノ酸配列が配列番号2に示されている第1部分であって、可変ドメインの最初のアミノ酸をコードするコドンから出発し、可変ドメインの最後のアミノ酸をコードするコドンで終わる第1部分、および

b) 軽鎖の不变部分の最初のアミノ酸をコードするコドンから出発し、不变部分またはそのフラグメントの最後のアミノ酸をコードするコドン、次いでナンセンスコドンで終わる軽鎖不变部分またはそのフラグメントをコードする第2部分を含む。好ましくは、この第1部分は、1位のアミノ酸から出発し、104位のアミノ酸で終わる配列番号2に示されたアミノ酸配列と実質的に同じアミ

ノ酸配列を有する可変ドメインをコードする。さらに好ましくは、第1部分は、244位のヌクレオチドから出発し、555位のヌクレオチドで終わる配列番号2に示されたヌクレオチド配列を有する。また好ましくは、第2部分は、ヒト軽鎖の不変部分、さらに好ましくはヒトκ鎖の不変部分をコードする。第1および第2 DNA構築物において、第1および第2部分は、好ましくはイントロンにより分離される。第1および第2分離間に位置するイントロンに、好ましくはエンハンサーを挿入する。転写されるが翻訳されないこの遺伝子要素の存在は、第2部分の有効な転写に必要とされ得る。さらに好ましくは、第1および第2 DNA構築物は、有利にはヒトに由来する重鎖遺伝子のエンハンサーを含む。第1または第2 DNA構築物は、有利には第1部分の上流に位置し、誘導ペプチドの部分をコードする第3部分を含む。この第3部分は、最初のアミノ酸をコードするコドンから出発し、誘導ペプチドの最後のアミノ酸で終わる。このペプチドは、それらが発現される宿主生物による鎖の分泌に必要とされ、続いて宿主生物により除去される。好ましくは、第1 DNA構築物の第3部分は、-19位のアミノ酸から出発し、-1位のアミノ酸で終わる、配列番号1に示されたアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列を有する誘導ペプチドをコードする。また好ましくは、第2 DNA構築物の第3部分は、-22位のアミノ酸から出発し、-1位のアミノ酸で終わる、配列番号2に示されたアミノ酸配列を有する誘導ペプチドをコードする。DNA構築物の各々を、適当な制御配列の制御下、特に適当なプロモーターの制御下に置く。DNA構築物が発現を目的として導入される宿主生物に適合するものであれば、いかなる種類のプロモーターでも使用され得る。しかしながら、発現がほ乳類細胞で行なわれる場合、免疫グロブリン遺伝子のプロモーターの使用が特に好ましい。所望の抗体は、細胞培養またはトランスジェニック動物において製造され得る。適当なトランスジェニック動物は、適当な制御配列下に置かれた第1および第2 DNA構築物を卵へマイクロインジェクションし、こうして製造された卵を適当な擬妊娠している雌に導入し、所望の抗体を発現する子孫を選択することを含む標準的方法に従い得られる。抗体鎖を細胞培養中で製造しなければならない場合、まずDNA構築物を単一発現ベクターまたは2種の別々ではあるが適合性のある発現ベクターへ挿入しなければならず、後者の候補が好ましい。従って、本発明はまた、上記DNA構築物のうちの少なくとも一つを含む、原核生物または真核生物セルラインにおいて複製可能な発現ベクターを提供する。次いで、DNA構築物を含む各発現ベクターを、適当な宿主生物へ導入する。DNA構築物を2種の発現ベクターにおいて別々に挿入する場合、それらは別々に導入されるか(すなわち1細胞に対し1タイプのベクター)、または同時導入され得、後者の候補が好ましい。

適当な宿主生物は、細菌、酵母またはほ乳類セルラインであり得、この後者が好ましい。さらに好ましくは、ほ乳類セルラインは、リンパ様起源、例えばミエローマ、ハイブリドーマまたは正常不死化B細胞に由来するが、内在性抗体重または軽鎖を全く発現しない。また、宿主生物は、1細胞当たり多数のコピーのベクターを含むのが好ましい。宿主生物がほ乳類セルラインである場合、この望ましい目標は、標準的方法に従いコピー数を増幅することにより達成され得る。増幅方法は、通常、高められた薬剤耐性に関する選択により構成され、前記耐性は発現ベクターによりコードされる。

【0013】本発明の別の態様では、(i)本発明の第1および第2 DNA構築物により形質転換された生物を培養し、(ii)培養物から活性CD25結合分子採取することを含む、マルチ鎖CD25結合分子の製造方法が提供される。別法として、重および軽鎖は、別々に採取され、インビトロ再生後に活性結合分子中へ再構成され得る。再構成方法は当業界ではよく知られている。方法の例は、特にEPA120674またはEPA125023に記載されている。従って、方法はまた、(i)本発明の第1 DNA構築物により形質転換された第1生物を培養し、重鎖またはそのフラグメントを培養物から採取し、そして(ii)本発明の第2 DNA構築物により形質転換された第2生物を培養し、軽鎖またはそのフラグメントを培養物から採取し、そして(iii)(i)で得られた重鎖またはそのフラグメントおよび(ii)で得られた軽鎖またはそのフラグメントから活性CD25結合分子をインビトロで再構成することを含み得る。同様に、また、(i)本発明の1本鎖または単ドメインCD25結合分子を各々コードするDNA構築物により形質転換された生物を培養し、(ii)培養物から前記分子を採取することを含む、1本鎖または単ドメインCD25結合分子の製造方法が提供される。

【0014】本発明のCD25結合分子は、例えばリンパ球混合反応(MLR)生物検定(アクバル等、「ジャーナル・オブ・イムノロジー」(J. Immunol.), 140, 2171-8)に示されている通り、非常に優れた免疫調節活性を呈する。MLRは、一般に、インビボ拒絶に導く異型の移植体応答のインビトロ均等反応であると考えられている。

1. MLRの阻害。

第1ドナーのHPBM製品から、 10^6 HPBMを含む $100\mu\text{l}$ 試料のアリコートを取り、 $0\sim 300\text{ng/ml}$ の範囲(これらの限界値を含む)における様々な濃度の本発明分子を加える。次いで、各試料を、第2ドナーの 10^6 個のHLA-不適合X線照射-HPBMまたはT細胞系過HPBMを含む $100\mu\text{l}$ アリコートと混合する。混合物を6日間 37°C でインキュベーションし、次いで $10\mu\text{l}$ 容量中 $1\mu\text{Ci}$ のメチル- ^3H -チミジン(^3H -Tdr)を加える。6時間後、放射能取り込みにより

細胞増殖を測定する。この特定検定では、本発明分子は、図6に示されている通り0.3ng/mlの濃度でインビトロ免疫調節活性を示す。細胞生長の50%は約3ng/mlで阻害される。また、本発明分子の免疫調節活性は、下記の要領で抗原特異的HPBM応答の阻害またはIL-2依存性Tリンパ芽球増殖の阻害を測定することにより評価され得る。

2. 抗原特異的HPBM応答の阻害。

本発明分子は、PPD(ツベルクリン)特異的、HLAクラスII制限T細胞応答の発生を有効に阻害し、このことは、レセプターに対する内在的に生成されたIL-2の結合阻害能力を示している。インビボでこれらの抗原特異的応答は、自己免疫性および移植拒絶の開始において重大な役割を演じると予測される。HPBMの製品から、 10^5 HPBM含有100 μ l試料のアリコートを取り、0~300ng/mlの範囲(これらの限界値を含む)における様々な濃度の本発明分子およびツベルクリン(PPD)を30 μ g/mlの最終濃度で加える。試料を、6日間37℃でインキュベーションし、次いで10 μ l容量中1 μ Ciのメチル- 3 H-チミジンを加える。6時間のインキュベーション後、放射能取り込みにより細胞増殖を測定する。この特定検定において、本発明分子は、図7に示されている通り約10ng/mlの免疫調節活性を示す。細胞生長の50%は、約50ng/mlで阻害される。

3. IL-2依存性Tリンパ芽球増殖の阻害。

本発明分子は、MLRまたはPPD刺激により誘発されたヒトT芽細胞のIL-2依存性生長を有効に阻害する。これらの細胞は、自己免疫性および拒絶症状発現の慢性化において主たる役割を演じると予想される。200 μ lの最終容量中20 $\times 10^3$ の5日令PPDまたはMLR刺激HPBMを含むトリブリケイト培養物を、5、10または20ng/mlの組換えIL-2および0~10 μ g/ml(これらの限界値を含む)の範囲における様々な濃度の本発明分子の存在下37℃で48時間インキュベーションする。次いで、 3 H-Tdrを加える。6時間後、放射能取り込みにより細胞増殖を測定する。この特定検定において、本発明分子は、図8Aおよび8B、8Cおよび8Dに示されている通り0.1 μ g/mlの濃度で免疫調節活性を示す。従って、本発明はまた、(i) ヒト免疫系の免疫抑制における本発明のCD25結合分子の用途、(ii) 処置を必要とする患者に対し、本発明のCD25結合分子の免疫抑制有効量を投与することを含む、ヒト免疫系の免疫抑制方法、(iii) 本発明のCD25結合分子および医薬的に許容し得る担体または希釈剤を含む、ヒト免疫系の免疫抑制を目的とする医薬組成物を提供する。特に、本発明のCD25結合分子は、移植拒絶症状発現の予防に有用である。

【0015】これらの適応症の場合、適当な用量は、勿論、例えば使用される特定の本発明分子、宿主、投与方

法並びに処置される状態の性質および重症度により変化する。しかしながら、予防用途の場合、体重1キログラム当たり約0.1mg~約1mgの一日用量で一般に満足すべき結果の得られることが示されている。拒絶事象が実際に生じた場合、それを処置するためには、これらの用量を4以下の係数により増加させるべきである。本発明分子は、好都合には、非経口的、通常例えば前肘静脈または他の末梢静脈へ静脈内投与される。予防処置としては、典型的には、移植当日、好ましくは移植の数時間前から始め、2~4週間1日1回~1週間に1回本発明分子を投与する。また、本発明分子は、CD25抗原を発現する細胞の悪性腫瘍の処置、例えばT細胞白血病およびある種の他の白血病およびリンパ腫の処置に有用であり得る。この用途の場合、CD25結合分子は、分子をアルファ-放出性放射性核種に結合させた放射性コンジュゲート形態で使用され得る。また、本発明分子は、HIV感染の処置または予防に有用であり得る。HIVウイルスは、増殖するために増殖性T細胞を必要とすると思われるため、CD25抗原の遮断によりT細胞の増殖を阻害すると、当然、ウイルス増殖も阻害される。本発明の医薬組成物は常法で製造され得る。本発明による組成物は、好ましくは凍結乾燥形態を呈する。即時投与の場合、適当な水性担体、例えば注射用滅菌水または滅菌緩衝食塩水にそれを溶かす。ボーラス注射としてではなく注入投与用に大量の溶液の調製が望ましいと考えられる場合、製剤時にヒト血清アルブミンまたは患者自身のヘパリンで凝血防止した血液を食塩水に混入させるのが有利である。過剰の上記生理学的不活性蛋白質が存在すると、注入溶液と共に使用されている容器および管の壁に吸着することによりモノクローナル抗体の喪失が阻止される。アルブミンを使用する場合、適当な濃度は食塩水溶液の0.5~4.5重量%である。本発明の別の態様によると、活性化T細胞に対する少なくとも2種の抗原結合分子であって、活性化T細胞に特有の少なくとも2種の異なる抗原を認識する結合分子を組み合わせる使用することにより、特に有益な結果が得られることが見出された。好ましくは、各々異なる抗原を認識する2種の異なる抗原結合分子の組み合わせを使用する。すなわち、抗原結合分子は両方とも活性化T細胞表面抗原を認識するが、それらは、活性化T細胞上の同じ結合部位に対して互いに争うことはない。好ましくは、抗原結合分子の一方はCD25結合分子である。従って、本発明はまた、少なくとも1個のCD25結合分子、および活性化T細胞に特有なCD25以外の少なくとも1個の抗原に対する少なくとも1個の抗原結合分子から成る混合物を含む免疫抑制組成物を提供する。

【0016】さらに本発明は、ほ乳類系の免疫抑制に使用される互いに組み合わせた活性化T細胞に対する少なくとも2つの抗原結合分子であって、活性化T細胞に特有な少なくとも2つの異なる抗原(ただし、これらのう

ち1つはCD25抗原である)を認識する結合分子を提供する。「活性化T細胞に対する抗原結合分子」という語は、活性化T細胞と強く反応するが残りのT細胞とは弱くしか、または全く反応しない結合分子を意味する。好ましくは、抗原結合分子は完全な免疫グロブリン分子、さらに好ましくはネズミ、キメラまたはヒューマナイズド抗体、特にキメラ・モノクローナル抗体である。好ましいCD25モノクローナル抗体は、上記アミノ酸配列を有するCDR'類を有する抗体である。有利には、本発明組成物はまた、免疫抑制剤、例えばシクロスポリンAを含み得るか、またはそれと組み合わせて使用され得る。CD25以外の活性化T細胞抗原に対する好ましいモノクローナル抗体は、典型的には、ボストン・ワークショップにより確立され、ラインヘルツ、ハynes、ナドラーおよびベルスタインにより「ロイコサイト・タイプII、ポリウムI・ヒューマンTリンフォサイト」(Leucocyte Typing II, Vol. I human T lymphocytes)(スプリング・フェルラーク、1985)に報告されているCD7クラスターに分類されるものである。CD7抗原は、残りのT細胞の約80%で異種的に発現される。しかしながら、この発現は、活性化時に強く増強される(強度は2-3倍上昇)。従って、抗体の好ましい組み合わせは、CD7とCD25抗体との組み合わせである。従って、本発明組成物は、好ましくは少なくとも1個のCD25抗体と一緒に少なくとも1個のCD7抗体から成る、さらに好ましくは1個のCD25抗体と1個のCD7抗体から成る混合物を含む。また好ましくは、両抗体はIgGアイソタイプに属する。所望により免疫抑制剤と一緒に使用され得る2つの抗体は、様々な方法で臨床的実践において使用され得る。好ましくは、それらと一緒に混合し、物理的混合物を患者に投与する。別法として、別々のレザーバーから受容者に抗体および所望による免疫抑制剤を任意の順序ではあるが同時に投与する。組成物は、単一CD25抗体に関する上記要領に従い製造および非経口投与され得る。別法として、免疫抑制剤を経口投与し、モノクローナル抗体を別々または混合物として非経口投与する。適当な組成物の調製を助けるため、モノクローナル抗体および所望による免疫抑制剤は、混合または同時投与に関する使用説明書と共に、同一容器内で別々にパッケージ化され得る。キットの例には、活性化T細胞に対する少なくとも2つの抗体であって、活性化T細胞に特有の少なくとも2つの異なる抗原(ただし、これらのうち1つはCD25抗原である)を認識する抗体の個別単位用量形態を含む例えばマルチバレル注射器またはツイン・バックがある。

【0017】これまでの研究は、抗体を互いに、そして所望により免疫抑制剤と組み合わせて投与すると、使用されている用量レベルでの許容し得ない副作用が回避されること、および個々の抗体により観察される副作用の強化が存在しないことを示している。予防用途の場合、

適当な用量は、通常、患者の体重1キログラム当たり0.05-0.5ミリグラム程度の第1抗体(例、CD25抗体)および体重1キログラム当たり0.05-0.5ミリグラム程度の第2抗体(例、CD7抗体)の投与を必要とする。免疫抑制剤がシクロスポリンである場合、所望により使用され得る免疫抑制剤の推奨量は、非経口投与の場合体重1キログラム当たり2-5ミリグラムおよび経口投与の場合体重1キログラム当たり10-15mgである。本発明組成物は、日毎または週毎、好ましくは週毎に投与され得る。本発明組成物は特に移植体拒絶症状発現の予防用に設計されているが、その用途は、好都合には拒絶事象が実際に生じたときのその処置をも包含し得る。この場合、用量を4の係数以下により増加させるべきである。この発明での使用に適したネズミ・モノクローナル抗体は自体公知である。活性化T細胞表面抗原に対する多くのモノクローナル抗体は、世界の様々な国々にあるカルチャー・コレクションから入手可能であり、具体的にはアメリカ合衆国、メリーランド、ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションは、適当なモノクローナル抗体または前記抗体を分泌するハイブリドーマを提供し得る。本発明で使用され得、ATCCから入手可能なCD7モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの一例は、T3-3A1である。他のCD7抗体は、RFT-2およびCHH380(キメラ抗体)である。CD25抗体としては、上述の好ましいRFT-5およびそのキメラ誘導体に加えて、M7/2(ガウルトン等、「クリニカル・イミュノロジー・アンド・イミュノパソロジー」(Clin. Immunol. and Immunopath.) (1985) 36:18)、抗-tac抗体(内山等、「ジャーナル・オブ・イミュノロジー」(J. Immunol.) (1981) 126(4):1393)およびキャンパス6モノクローナル抗体が含まれる。CD25およびCD7モノクローナル抗体の組み合わせの相乗効果は、上記MLR生物検定によりインビトロで、またヒト患者に関する臨床試験によりインビボで立証される。MLR生物検定において、³H-TdR取り込みの阻害は、CD7(RFT2)またはCD25(RFT5)モノクローナル抗体が単独に加えられた培養物中で観察され、これらの抗体の両方を同じ総濃度と一緒に使用すると、かなり大きな程度の阻害が行なわれる。MLRは、インビボ拒絶に至る同種間移植体応答のインビトロ均等反応であるが、上記阻害はインビボ免疫抑制と均等内容である。CD7またはCD25モノクローナル抗体の存在下、10ナノグラム/ml-100μg/mlの用量範囲でシクロスポリンが加えられたMLRでは、全用量範囲においてシクロスポリン単独の場合と比べて³H-TdR阻害の増加が観察される。CD7、CD25およびシクロスポリンの組み合わせは、他の組み合わせよりも大きな阻害効果を示す。臨床試験において、腎臓、肝臓または心臓移植を受ける予定の患者を予防的治療用に選択する。移植当日、手術の

2時間前、実施例5のキメラCD25抗体をキメラCD7抗体(CHH380)と一緒に用いた初回静脈内注入を、体重1kg当たり各抗体0.2mgの用量で実施する。手術の2日後、体重1kg当たり0.4mgでの2つの抗体の同一注入を実施し、次いで1週間隔で1か月間反復する。静脈内注入液は次の要領で製造される。凍結乾燥抗体と一緒に混合し、4.5重量%のヒト・アルブミンを含む100ml滅菌緩衝食塩水中に分散させる。この食塩水分散液を30分間かけて患者に投与する。患者はまた、標準的シクロスポリン療法も受けている。1箇月の治療期間中、拒絶症状が発現した患者はいない。

【0018】図面の説明

図1Aは、IgG分子並びに重および軽鎖をコードする遺伝子の構造を示す概略図である。図1Bは、フレーム構造(FR)および高可変(CDR)領域に対する重または軽鎖の可変ドメインの配置を表す図である。図2Aおよび2Bは、ネズミ重鎖エンハンサー(図2A)をコードするか、またはマウスC κ および5つのJ κ 遺伝子セグメント(図2B)をコードする、³²P標識DNAプローブを用いたサザン・プロットによる、マウス・ハイブリドーマRFT5-IgG2a(1)、RFT5-IgG1(2)、RFT4(3)およびNS-1(4)のEcoRI-消化ゲノムDNAの分析を示す図である。10 μ gのゲノムDNAをEcoRIで消化し、0.8%アガロース・ゲルにおいてサイズ分画化する。次に、フラグメントをニトロセルロース膜へ移し、プローブとハイブリダイゼーションさせる。洗浄後、膜を一夜コダックX-Oマツ・フィルムに暴露する。図3Aおよび3Bは、親発現ベクターpSV2-neo-huC γ 1およびpSV2-DHFR-E μ -huC κ を示す図である。両プラスミドは、アンピシリン耐性遺伝子(amp \cdot R)並びにpBR322およびSV40の複製開始点(pBR322oriおよびSV40ori)を含む。pSV2-neo-huC γ 1は、ネオマイシン遺伝子(neo \cdot R)およびヒト γ 1不変部分をコードする遺伝子(huC γ 1)の存在を特徴とするが、pSV2-DHFR-E μ -huC κ には、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子(メトトレキセイト耐性)およびヒト κ 不変部分をコードする遺伝子(huC κ)が挿入されている。キメラ重または軽鎖を発現させるための最終ベクターは、各々誘導ペプチド(L)、およびヒト重鎖エンハンサーと一緒にRFT5-IgG2a重鎖の可変ドメイン(VDJ₂)をコードするDNAフラグメントを、pSV2-neo-huC γ 1へ挿入し、誘導ペプチド(L)およびRFT5-IgG2a軽鎖の可変ドメイン(VJ₂)をコードするDNAフラグメントを、pSV2-DHFR-E μ -huC κ へ挿入することにより得られる。図4Aおよび4Bは、各々実施例5記載の方法AおよびBに従い、増加濃度のメトトレキセイト(MTX)で生長させた個々の細胞プールの生産性を示す図である。グラフのY軸は、72時間でmg/10⁵細胞において生産されたモノクローナ

ル抗体の量を与える。図5は、4つのフレーム構造領域と一緒に融合させた形で含むベクターへのCDRカセットの挿入による、CDR置換物を構築するためのプロトコルを示す図である。図6は、(x)RFT5-IgG2a(γ 2a, κ)および(o)本発明のネズミ-ヒト・キメラMAb(γ 1, κ)によるMLRの阻害を示す図である。両モノクローナル抗体とも、配列番号1および2に示された可変ドメインを有する。図7は、(x)RFT5-IgG2aおよび(o)同じネズミ-ヒト・キメラMAbによるPPD特異的HPBM応答の阻害を示す図である。図8は、5ng/ml(o)、10ng/ml(\cdot)および20ng/ml(x)のIL-2濃度における、PPD Tリンパ芽球増殖(図8Bおよび8A)およびMLR Tリンパ芽球増殖(図8Dおよび8C)に対するRFT5-IgG2aおよび同じネズミ-ヒト・キメラMAbの効果を示す図である。単に説明を目的として、本発明のキメラCD25抗体の具体的な製造例を下記に示す。

【0019】

【実施例】

20 実施例1

RFT5-IgG2aの重鎖の可変ドメインをコードする遺伝子のクローニング。

ハイブリドーマRFT5-IgG2a(CD25, γ 2a, κ)、RFT5-IgG1(CD25, γ 1, κ)およびRFT4(CD4, γ 1, κ)並びにハイブリドーマの親ミエローマ・セルライン、すなわちNS-1のゲノムDNAを単離し、EcoRIで消化する。次いで、消化された各DNAを同じアガロース・ゲルにおいて分画する。移動後、ネズミ重鎖エンハンサーをコードする³²P-標識0.7kb XbaI-EcoRI DNAフラグメントをプローブとして用いたサザン・プロットによりアガロース・ゲルを分析する(ハインリッヒ等、「ジャーナル・オブ・イミューノロジー」(J. of Immunol.)(1989)、143:3589)。図2に示されている通り、ハイブリダイゼーション後、3タイプのバンドがゲル上に現れる。6.5kbのEcoRIフラグメントは、NS-1、すなわち親ミエローマ・セルラインを含む全セルラインのDNA消化物に存在するため、興味の対象外である。2.9kbのEcoRIフラグメントは、ハイブリドーマRFT5-IgG1のDNA消化物において検出されるだけであり、異常な遺伝子配置の結果であると考えられる。従って、親セルラインNS-1のDNA消化物に存在しない6.8kbのEcoRIフラグメントは、選り抜きのフラグメントであるため、プレパラティブ・アガロース・ゲル電気泳動によりこのフラグメントをさらに精製する。約5-7kbのDNAフラグメントを、バクテリオファージZAP(ストラタジーン)のEcoRI制限部位でクローン化する。上記プローブを用いて、6 \times 10⁶の組換えファージをスクリーニングすると、11のクローンがハイブリダイゼーションすることが判る。11クローンのD

19

NA挿入物を、ネズミJ_κ遺伝子をコードする第1オリゴヌクレオチドおよびアミノ酸番号7までのRFT5重鎖の開始をコードする第2オリゴヌクレオチド(既に決定された配列)をプライマーとして用いたポリメラーゼ鎖反応(PCR)によりファージ・プレート・リゼイトにおいて増幅した。第2プライマーは、最頻出コドン使用遺伝子を考慮して設計される。11クローンの各々から得られたDNAフラグメントを、同じく再頻出コドン使用に従い設計されたRFT5重鎖のアミノ酸20ないし27を含むアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドをプローブとして用いたサザン・プロットにより分析する。プローブを用いて、9つの同一ファージ・クローンが明らかにされる。ジデオキシ終結方法により可変ドメインをコードするDNA挿入物の部分の配列決定を行うと、配列番号1に示した通りであった。

【0020】実施例2

キメラRFT5重鎖遺伝子の構築。

9つのファージ・クローンのうちの一つのDNAの消化により得られ、RFT5重鎖可変ドメイン(プロモーターおよびエンハンサーを含む)の遺伝子を含む6kbのEcoRIフラグメントを、図3Aに示されている真核生物発現ベクターpSVneo-human γ_1 不変部分(ハインリッヒ等、前出)のEcoRI制限部位へクローン化する。次いで、RFT5重鎖可変ドメインをコードする遺伝子のヌクレオチド配列を再決定することにより、この遺伝子における突然変異がプラスミドの伸長中に行なわれたという可能性を排除する。

【0021】実施例3

RFT5の軽鎖の可変ドメインをコードする遺伝子のクローニング。

ハイブリドーマRFT5、RFT5*およびRFT4並びに親セルラインNS-1のゲノムDNAを単離し、EcoRIで消化する。次いで、消化された各DNAを同じアガロース・ゲルにおいて分画する。移動後、5つのマウスJ κ 遺伝子およびマウスC κ 遺伝子を含む³²P標識DNAフラグメントをプローブとして用いたサザン・プロットにより、アガロース・ゲルを分析する。ハイブリダイゼーション後、図2Bに示されている通り、約12、16および18kbの3つの主たるタイプのバンドがゲル上で明らかにされる。最大フラグメントは、RFT5ハイブリドーマに特異的なものだけである。約18kbのサイズ分画されたEcoRIフラグメントを、ファージEMBL4(ストラタジーン)においてクローン化する。7×10⁵の組換えファージ・クローンを上記プローブでスクリーニングした結果、各々同じ18kb挿入物を含む2つのクローンがハイブリダイゼーションすることが見出された。4.4kbのEcoRI-XbaIサブフラグメントは、RFT5軽鎖可変ドメインをコードする完全遺伝子を含むことが示されており、これらをプラスミドpGEM4(ストラタジーン)へクローン化する。4.4kb

20

フラグメントの配列を決定する。可変ドメインをコードする4.4kbのDNA挿入物の部分の配列決定を行う。配列は、配列番号2に示されている。

【0022】実施例4

キメラRFT5軽鎖遺伝子の構築。

ネズミ重鎖エンハンサー(ハインリッヒ等、前出)をコードする1.1kbのXbaI-XbaIフラグメントを、ヒト κ 不変部分をコードするHindIII-SphIフラグメントと一緒に、ファージmp18(ストラタジーン)においてサブクローニングする。突然変異誘発により制限部位を分裂させた後、ネズミ重鎖エンハンサー(E μ)およびヒト κ 不変部分(huC κ)の配列を含む充填されたEcoRI-HindIIIフラグメントを、pSV2-DHFRの充填されたEcoRI-BamHI部位でクローン化する。pSV2-neoのBamHI-HindIIIフラグメントを、DHFR遺伝子をコードするBamHI-HindIIIフラグメントと置き換えることにより、pSV-DHFRが得られる。次いで、実施例3の4.4kbのEcoRI-XbaIフラグメントを、pSV-DHFR-E μ -hu κ に挿入する。

【0023】実施例5

RFT5キメラ抗体の発現。

実施例2および4で得られたプラスミドを、バイオラド製の遺伝子バルサー装置を用いたエレクトロポレーションにより、マウス・ミエローマ・セルラインSP2/O(ATCC CRL1581)において同時トランスフェクションする。この技術は、高頻度で安定したトランスフェクタントを作成することが知られている。SP2/Oセルラインは、内在性重および軽鎖を製造し得ず、0.8mg/lの濃度でジェネティシン(G418)に感受性を示す。SP2/O細胞を、通常の生長培地(RPMI+10%FCS+5×10⁻⁵ β -メルカプトエタノール)中で生長させ、生長中期で採取し、エレクトロポレーション緩衝液(バイオラド)で洗浄する。細胞濃度を2×10⁷細胞/mlに調節する。0.8mlの細胞懸濁液に、15-20 μ gの各プラスミドを加える。混合物を氷上に置き、10分間放置する。次いで、細胞を電気パルス(280ボルト、25 μ F)にかけ、再び15分間放置する。細胞を通常の生長培地へ移し、CO₂インキュベーター中37℃でインキュベーションする。3日間のインキュベーション後、G418耐性に関する選択を始める。1.4mg/mlのG418を含む新鮮な培地に細胞を再懸濁する。G418の存在下10-14日間インキュベーションした後、培養物から生長中の細胞が得られる。2週間のインキュベーション後、サンドイッチ・タイプELISA(抗ヒト κ -軽鎖/上清/抗ヒトIgG-アルカリ性ホスファターゼ・コンジュゲート)におけるヒトIgG発現について全面生長培養物の上清を試験する。この試験は、完全な抗体分子が、50-500ng/mlの範囲の様々な濃度で全培養物から分泌されることを

示している。DHFR遺伝子が増幅される細胞を選択し、それによって所望の抗体を多量に分泌させるため、メトトレキサート(MTX)耐性に関する2つの選択方法を、下記要領で行う。この目的のため、G418耐性細胞プールを各々分割し、方法A(2または2.5の係数によるMTX増加)または方法B(5の係数によるMTX増加)に従い、増幅を続行させる。

【化1】

方法 A	方法 B
100nM MTX	200nM MTX
250nM MTX	1μM MTX
500nM MTX	5μM MTX
1μM MTX	25μM MTX
2.5μM MTX	100μM MTX
5μM MTX	
10μM MTX	
25μM MTX	
100μM MTX	

各増幅段階では、1.4mg/kgのG418および選択された濃度のMTXを補った通常の生長培地において 2×10^5 細胞/mlの密度で細胞を接種する。72時間のインキュベーション後、細胞および上清を分離する。EL

ISAまたはプロテインAカラムを用いたHPLCにより抗体分泌をモニターする。図4Aおよび4Bは、幾つかのトランスフェクタントのプールの抗体生産性を示す。プールの大部分は、あるMTX濃度での最大の特異的抗体生産状態に到達する。最良生産性プールを制限希釈によりクローン化する。分析された数百のクローンから、15の最良生産性クローンが選択される。クローンの生産性は、72時間で30~50mgMAb/ 10^5 細胞の範囲である。プロテインAアフィニティー・カラムでの溶離により、培養上清から抗体を精製する。

【0024】(配列表)

配列番号: 1

主対象: RFT5抗体の免疫グロブリン重鎖可変ドメイン

配列タイプ: ヌクレオチド配列およびその対応するアミノ酸配列

分子タイプ: GenomicDNA

長さ: 492ヌクレオチド

本来の供給源: ネズミ・ハイブリドーマ

20 ヌクレオチド配列の特徴:

イントロンは、ヌクレオチド47~130に位置する。

Vセグメント遺伝子: ヌクレオチド142~435

Dセグメント遺伝子: ヌクレオチド436~447

Jセグメント遺伝子: ヌクレオチド448~492

アミノ酸配列の特徴:

誘導ペプチド: アミノ酸(a.a.)-19~-1

FR1: a.a. 1~30

CDR1: a.a. 31~35

FR2: a.a. 36~49

30 CDR2: a.a. 50~66

FR3: a.a. 67~98

CDR3: a.a. 99~106

FR4: a.a. 107~117。

【化2】

23
ATC GAA TGT AAC TGG ATA CTT CCT TTT ATT CTG TCG GTA ATT TCA G 46
Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ile Ser
-15 -10 -5

GTAAGGGGCT CACCAGTTCC ATATCTGAAA GAGGATACAG GGTCTGAAGT CACAATGACA 106

TCTACTCTGC TGTCTCTCC ACAG GG GTC TAC TCA GAG GTT CAG CTC CAC 136
Gly Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln
-1 1 5

CAG TGT GGG ACT GTG CTG GCT AGG CCT GGG GCT TCC CTC AAG ATG TCC 204
Gln Ser Glu Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser
10 15 20

TGC AAG GCT TGT GGC TAC AGC TTT ACC AGC TAC TCG ATG CAC TCG ATA 252
Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Trp Met His Trp Ile
25 30 35

AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTA GAA TGG ATT GGT GCT ATT TAT CCT 300
Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro
40 45 50

GGA AAT AGT GAT ACT AGT TAC AAC CAG AAG TTC CAG GGC AAG GCC AAA 348
Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Lys Ala Lys
55 60 65

CTG ACT GCA GTC ACA TCC GCC AGC ACT GCC TAC ATG CAG CTC AGC ACC 396
Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
70 75 80 85

CTG ACA CAT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT TCA AGA GAC TAC GGC 444
Leu Thr His Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Asp Tyr Gly
90 95 100

TAC TAC TTT GAC TTC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA 492
Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
105 110 115

【0025】(配列表)

配列番号: 2

主対象: RFT5抗体の免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン

配列タイプ:ヌクレオチド配列およびその対応するアミノ酸配列

分子タイプ: Genomic DNA

長さ: 455ヌクレオチド

本来の供給源: ネズミ・ハイブリドーマ

ヌクレオチド配列の特徴:

イントロンは、ヌクレオチド50~226に位置する。

Vセグメント遺伝子: ヌクレオチド244~519

J₂セグメント遺伝子: ヌクレオチド520~455

アミノ酸配列の特徴:

誘導ペプチド: アミノ酸(a.a.)-22~-1

FR1': a.a. 1~23

CDR1': a.a. 24~33

FR2': a.a. 34~48

CDR2': a.a. 49~55

FR3': a.a. 56~87

40 CDR3': a.a. 88~94

FR4': a.a. 95~104.

【化3】

25
 ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA G 49
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 -20 -15 -10

GTAACAGAGG GCAGGGAATT TGAGATCAGA ATCCAACCAA AATTATTTTC CCTGGGGAAT 109

TIGAGTCTAA AATACAGTTT TTTTTCITTT TTTTTCATCT GAATGTTGGG TGGTATAAAA 169

TTATTTTGT TTTCTATTT CTACTAATCC CTTCCTCTCT ATTTTGCTTT TTCTTAG 226

TC ATA CTG TCC AGA GGA CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC 273
 Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 -5 -1 1 5 10

ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC 321
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 15 20 25

TCA AGT ATA AGT TAC ATG CAG TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC ACC TCC 369
 Ser Ser Ile Ser Tyr Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
 30 35 40

CCC AAA AGA TGC ATT TAT GAC ACA TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT 417
 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 45 50 55

GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAT TCT CTC ACA ATC 465
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 60 65 70

AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TCC CAT CAG CGG 513
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg
 75 80 85 90

AGT AGT TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAA CTG GAA ATA AAA 555
 Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 95 100

【0026】

【表1】

領域	重鎖における位置	軽鎖における位置
FR 1	アミノ酸1~30(0位に偶発的残基を伴う)	アミノ酸1~23(入鎖の0位に偶発的残基および10位に欠失を伴う)
CDR 1	アミノ酸31~35(35A、35Bと番号付された挿入体が存在し得る)	アミノ酸24~34(27A、B、C、D、EおよびFと番号付された挿入体が存在し得る)
FR 2	アミノ酸36~49	アミノ酸35~49
CDR 2	アミノ酸50~65(52A、BおよびCと番号付された挿入体が存在し得る)	アミノ酸50~56
FR 3	アミノ酸66~94(82A、BおよびCと番号付された挿入体が存在し得る)	アミノ酸57~88
CDR 3	アミノ酸95~102(100A、B、C、D、E、F、G、H、I、JおよびKと番号付された挿入体が存在し得る)	アミノ酸89~97(95A、B、C、D、EおよびFと番号付された挿入体が存在し得る)
FR 4	アミノ酸103~113	アミノ酸98~107(106Aと番号付けさ

【0027】

【図面の簡単な説明】

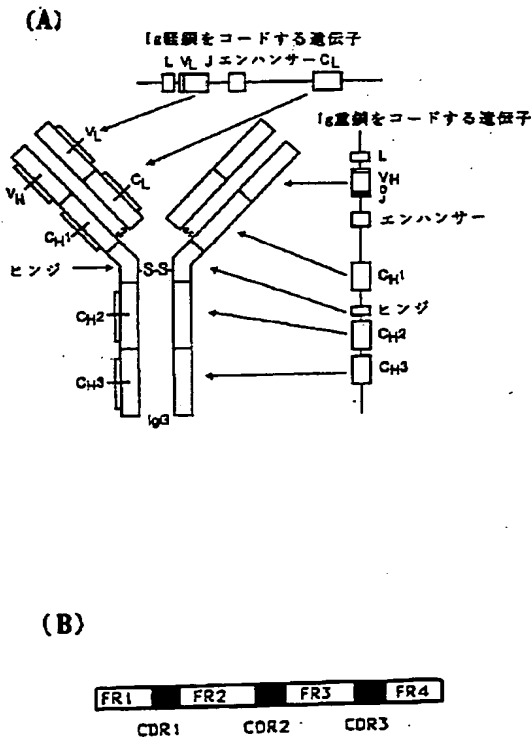
【図1】 Aは、IgG分子並びに重および軽鎖をコードする遺伝子の構造を示す概略図である。Bは、フレーム構造(FR)および高可変(CDR)領域に対する重または軽鎖の可変ドメインの配置を表す図である。

【図2】 AおよびBは、それぞれネズミ重鎖エンハンサー(A)をコードするか、またはマウスC κ および5つのJ κ 遺伝子セグメント(B)をコードする、³²P標識DNAプローブを用いたサザン・プロットによる、マウス・ハイブリドーマRFT5-IgG2a(1)、RFT5-IgG1(2)、RFT4(3)およびNS-1(4)のEcoRI-消化ゲノムDNAの分析を示す図である。

【図3】 AおよびBは、それぞれ親発現ベクターpSV2-neo-huC γ 1(A)およびpSV2-DHFR-E μ -huC κ (B)を示す図である。

【図4】 AおよびBは、各々実施例5記載の方法Aおよび

【図1】



れた挿入体が存在し得る)

びBに従い、増加濃度のメトトレキセイト(MTX)で生長させた個々の細胞プールの生産性を示す図である。

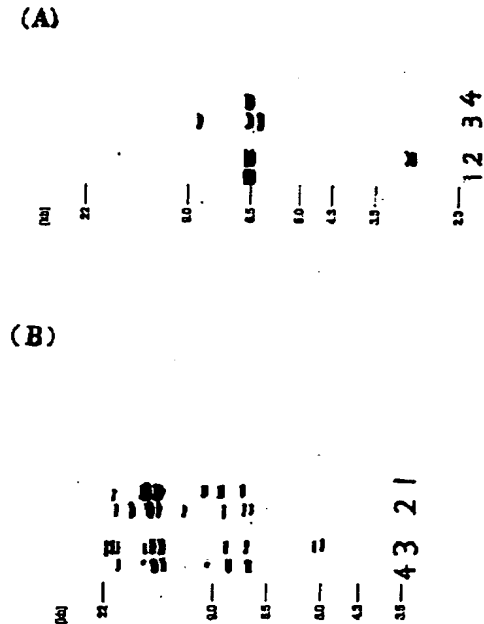
【図5】 4つのフレーム構造領域を一緒に融合させた形で含むベクターへのCDRカセットの挿入による、CDR置換物を構築するためのプロトコルを示す図である。

【図6】 (x) RFT5-IgG2a(γ 2a, κ)および(o)本発明のネズミ-ヒト・キメラMAb(γ 1, κ)によるMLRの阻害を示す図である。

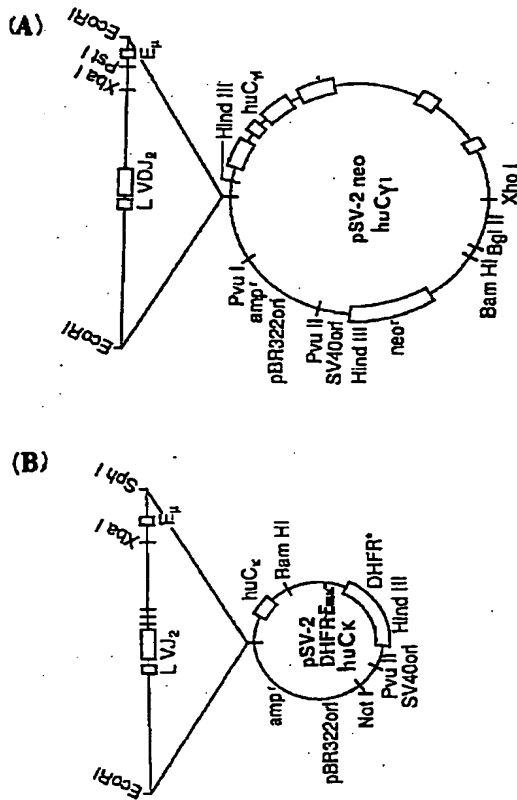
10 【図7】 (x) RFT5-IgG2aおよび(o)同じネズミ-ヒト・キメラMAbによるPPD特異的HPBM応答の阻害を示す図である。

【図8】 5ng/ml(o)、10ng/ml(・)および20ng/ml(x)のIL-2濃度における、PPD Tリンパ芽球増殖(BおよびA)およびMLR Tリンパ芽球増殖(DおよびC)に対するRFT5-IgG2aおよび同じネズミ-ヒト・キメラMAbの効果を示す図である。

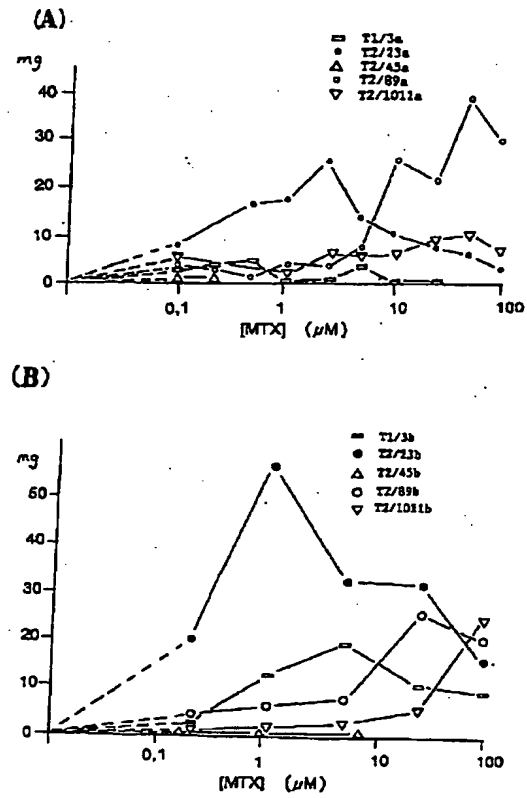
【図2】



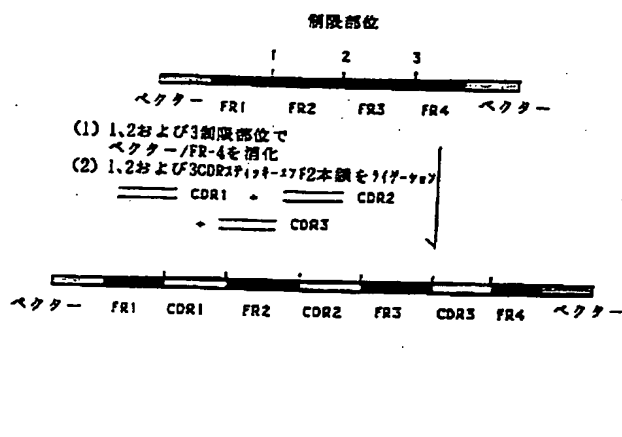
【図3】



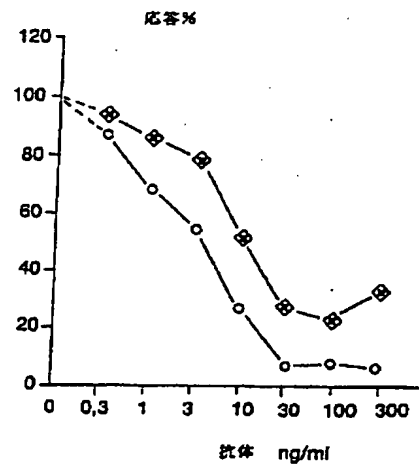
【図4】



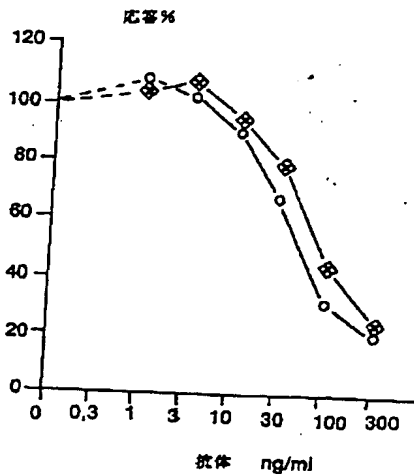
【図5】



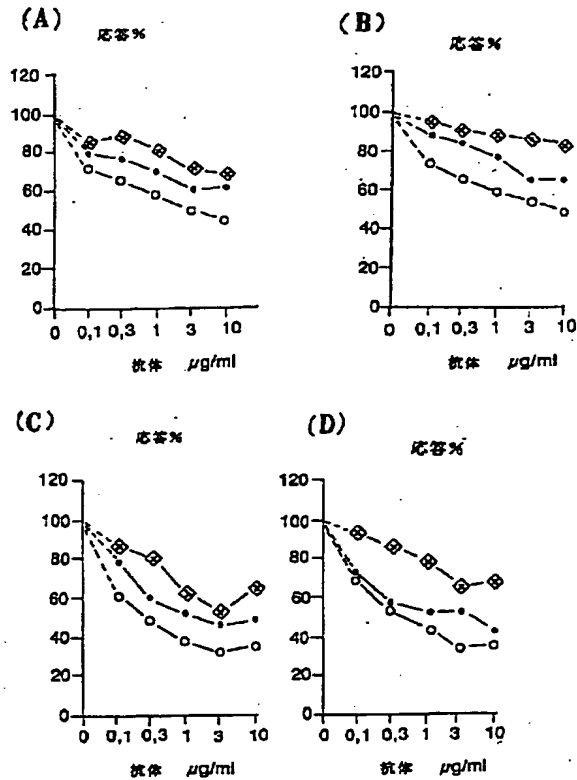
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所

C 1 2 N 15/13

C 1 2 P 21/02

C 8214-4B

21/08

8214-4B

//(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(71) 出願人 591072514

ロイヤル・フリー・ホスピタル・スクー
ル・オブ・メディスン

ROYAL FREE HOSPITAL

SCHOOL OF MEDICINE

イギリス、イングランド、ロンドン・エヌ

ダブリュー・3・2ピーエフ、ローランド・

ヒル・ストリート (番地の表示なし)

(72) 発明者 アーネ・ナルボン・アクバール

イギリス、イングランド、サリー・テイダ

ブリュー・9・4エルデイ、リッチモンド、

ダンサー・ロード35エイ番

(72) 発明者 ギュンター・ハインリツヒ

スイス、ツエーハー・4125リーヘン、モル

ハルデンシユトラーセ166ペー番

(72) 発明者 サルバトーレ・カミスリ

スイス、ツエーハー・4153ライナツハ、ア

ーホルンシユトラーセ2番